

Trinitrobenzene sulfonic acid로
유도한 대장염에서 대장통과시간
변화 및 장벽내 nitric oxide
synthase의 분포

연세대학교 대학원

의 학 과

조 승 현

Trinitrobenzene sulfonic acid로
유도한 대장염에서 대장통과시간
변화 및 장벽내 nitric oxide
synthase의 분포

지도 박 호 진 부교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2003년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

조 승 현

조승현의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2003년 12월 일

감사의 글

이 논문의 시작부터 완성까지 격려와 가르치심
그리고 충고를 베풀어 주신 박효진 교수님께 먼저
진심으로 감사드립니다.

그리고 이 논문이 완성되기까지 지도하여 주신
소화기내과 정준표 교수님과 생리학교실 이영호
교수님께도 깊이 감사드립니다.

연구 진행에 물심양면 도와주신 영동세브란스병원
내과학 교실 강사 지상원 선생님과 의국 동기들
에게도 진심으로 감사드립니다.

끝으로 오늘날까지 끊임없는 사랑과 격려를 주시는
아버지와 어머니 그리고 장인 어른과 장모님,
사랑하는 아내 이지영과 논문 완성의 기쁨을 함께
하고 싶습니다.

저자 씀

목 차

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	5
1. 연구 재료	5
2. 연구 방법	5
가. 대장 통과 시간 측정	5
나. 면역 조직 화학 염색	6
III. 결과	8
1. 대조군과 TNBS 주입군에서의 대장통과 시간의 측정	8
2. 대조군과 TNBS 주입군에서의 nNOS 양성 세포의 분포	8
3. 대조군과 TNBS 주입군에서의 iNOS 양성 세포의 분포	8
IV. 고찰	12
V. 결론	16

참고문헌	18
------------	----

영문요약	21
------------	----

그 립 차 례

그림 1. Measurement of colonic transit time	7
그림 2. nNOS immunoreactivity	9
그림 3. nNOS immunoreactivity in the myenteric plexus	9
그림 4. iNOS immunoreactivity	10
그림 5. iNOS immunoreactivity in the myenteric plexus	10
그림 6. nNOS and iNOS immunoreactive ganglion cells in the myenteric plexus	11

표 차 례

표 1. Colonic transit time in TNBS induced colitis	11
---	----

Trinitrobenzene sulfonic acid로 유도한 대장염에서 대장통과시간 변화 및 장벽내 nitric oxide synthase의 분포

Nitric oxide (NO)는 대장에서 연동 반사시 미충 윤상근의 이완에 관여하는 물질로서, 정상적인 생리조건에서는 endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 및 neuronal NOS (nNOS)에 의해 주로 생성되며, 대장염시에는 다양한 염증세포로부터 합성된 inducible NOS (iNOS)에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다. 최근 박 등은 trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) 유도 기니 픽 대장염 모델에서 대장통과 시간은 약제 주입 후 3일째부터 유의하게 지연되지만 염증의 정도와 상관 관계를 보이지 않으며, 무스카린성 수용체를 통한 평활근 세포의 수축 반응에는 이상이 없음을 보고하였다. 본 연구에서는 기니 픽에게 TNBS로 유도한 실험적 대장염 모델에서 대장통과시간의 변화 여부를 관찰하고, TNBS 노출 기간에 따른 nNOS와 iNOS의 장벽내 분포를 조사하여 대장통과시간 변화와 니트레직(nitroergic) 신경분포와의 상관 관계를 알아보려고 하였다.

실험 결과, 대장통과시간은 TNBS 투여군에서 3, 7, 14일 째에 대조군에 비하여 유의하게 지연되는 것을 관찰하였다. nNOS 양성 세포는 대조군에서 점막, 점막하층, 고유근층, 점막하 신경층, 그리고 장근 신경층에서 골고루 관찰되었다. TNBS 주입군에서는 주로 염증이 유발된 점막 및 점막하층에서 nNOS 양성 세포의 감소가 관찰되

었으나, 각 군에서 장근 신경총의 nNOS 양성 신경세포의 수는 유의한 차이를 보이지 않았다. iNOS 양성 세포는 대조군에서 주로 점막하 신경총 및 장근 신경총에서 관찰되었다. TNBS 주입군에서는 주로 염증이 유발된 점막 및 점막하층에서 iNOS 양성 세포의 증가가 관찰되었으나 TNBS 노출기간에 따른 변화는 관찰되지 않았으며, 각 군에서 장근 신경총 내 iNOS 양성 세포의 수는 유의한 차이를 보이지 않았다.

결론적으로 TNBS 유도 기니 픽 대장염에서 대장통과시간이 유의하게 지연되었으며, 장근 신경총내 nNOS와 iNOS 양성 세포의 분포 변화는 대장통과시간 변화에 주 역할을 하지 않는 것으로 생각된다.

핵심되는 말 : colonic transit, colitis, nitric oxide synthase, tri-nitrobenzene sulfonic acid

Trinitrobenzene sulfonic acid로 유도한 대장염에서 대장통과시간 변화 및 장벽내 nitric oxide synthase의 분포

지도 박 효 진 부교수

연세대학교 대학원 의학과

조 승 현

I. 서 론

위장관의 연동운동(peristalsis)은 다양한 감각경로를 통해 전달된 자극이 장근 신경총(myenteric plexus)내의 여러 신경원(neuron)을 자극하여 상향 흥분성 반사(ascending excitatory reflex)와 하향 억제성 반사(descending inhibitory reflex)를 통해 구축 평활근의 수축과 미축 평활근의 이완으로 이루어진다.¹ 이러한 소화관의 운동은 다양한 원인의 위장관 염증에 의해 가속 혹은 지연되는데, 염증으로 인한 평활근 수축의 변화는 평활근 자체, 신경전달물질에 대한 반응, 혹은 장관 신경에 대한 영향 등에 기인하는 것으로 알려져 있다.² 박 등³의 연구에 의하면 trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)로 유도한 기니 픽 실험적 대장염 모델에서 대장통과 시간이 지연되는데, 그 기전이 평활근 자체의 문제는 아님을 확인하였다.

Nitric oxide (NO)는 대표적인 신경전달물질의 하나로 혈관 내피세포, 중추 및 장 신경계의 신경원, 단핵구 및 대식세포 등의 면역 세포를 비롯한 다양한 세포로부터 L-arginine의 guanidine group으로부터 합성된다.^{4,5} NO 합성효소 (nitric oxide synthase, NOS)로는 endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS), 그리고 inducible NOS (iNOS)의 3가지 종류가 알려져 있다.^{6,7} 정상적인 생리조건에서 NO는 eNOS 및 nNOS에 의해 주로 생성되며, 혈관 및 장 평활근의 이완, 신경전달 등의 기능을 담당하게 된다.⁶ 반면 염증이 있는 경우 내피세포와 다양한 염증세포로부터 iNOS가 합성되어 다량의 NO를 생산하는 것으로 알려져 있다. 궤양성 대장염 및 크론병 환자의 경우에 대장의 NO 생산과 NOS의 활성도가 증가되어 있으며,^{8,9} 흰쥐를 사용한 동물 실험에서도 대장염시에 iNOS의 합성이 증가된다는 보고들이 있다.¹⁰⁻¹²

본 연구에서는 TNBS로 유도한 기니 픽 실험적 대장염 모델에서 시기에 따라 대장통과 시간이 변화되는지 알아보고, 또한 그 기전을 설명하고자 TNBS 노출 기간에 따른 장근 신경총 및 장벽 내 iNOS와 nNOS의 분포 변화를 면역조직화학염색을 통해 조사하여 대장통과 시간의 변화 기전을 알아보고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 연구 재료

약 250 gram 정도의 수컷 기니 픽(Hartley) 45마리를 사용하였다. 실험적 대장염 유발 및 재료 채취를 위해 기니 픽 45마리를 세균으로 분류하여, 24시간 금식 후 ketamine 0.25 mL (57.68 mg/mL)을 복강 내 투여하여 마취한 후, 50% 에타놀에 녹인 2,4,6-TNBS (80 mg/kg) 0.3 mL를 폴리에틸렌 카테터를 통해 항문연 상방 약 8 cm 부위의 대장 내로 주입하였다. 대조군으로는 생리 식염수 0.3 mL (n=5) 또는 TNBS의 점막세포 투과를 원활하게 하기 위해 사용한 50% 에타놀 0.3 mL (n=5)를 투여하여 2일 후 희생시켰다. 약물 투여 후 1, 2, 3, 7, 그리고 14일째에 (각각 n=7) 후두부를 강타하여 실신시킨 후 경정맥을 절단, 실혈시켜 즉사시킨 후 대장을 적출하였다.

항문연으로부터 약 15 cm 길이의 대장을 적출하여 근위부 10 cm은 대장 통과 시간 측정에 이용하고, 나머지 원위부 부위를 채취하여 iNOS와 nNOS에 대한 면역조직화학염색에 이용하였다.

2. 연구 방법

가. 대장통과 시간 측정 :

TNBS로 유도된 실험적 대장염에서 대장통과시간의 변화 유무를 알아보고자 다음의 실험을 시행하였다. 채취한 10 cm 길이의 대장을 Krebs-Henseleit (K-H)용액으로 세척한 후, 95% O₂와 5% CO₂의 혼합 기체가 공급되고 온도가 37°C로 유지되는 K-H 용액을 채운 자체 제작한 욕조 양측단에 연결하였다. 60분간 평형을 유지한 후, 기니 픽 대변의 형태 및 굳기와 유사하게 만든 인공 배설물 (12 mm x 4 mm)을 구측단에 넣은 후, 연동 펌프(Masterflex 7523-30

with cartridge 3519-85, Cole-Palmer, Chicago, IL, USA)를 통해 장 내강내로 K-H 용액을 0.4 mL/min의 유속으로 관류시키면 연동 수축과가 유발되어 인공 배설물이 항문측으로 이동하게 되는데, 2 cm 간격으로 인공 배설물이 이동하는 시간을 구하였다. 첫 2 cm 길이의 이동에 걸리는 시간을 제외한 나머지 4구획에서의 이동 시간의 평균값을 얻어서 평균 대장통과시간을 구하였다(그림 1).

나. 면역조직화학염색 :

10% 포르말린에 고정하고, 파라핀 포매된 조직 블록을 약 4 μm 두께의 절편으로 만들어 슬라이드에 부착시킨 후 xylene으로 탈파라핀 시키고, 100% 고농도 알코올에서 70% 저농도 알코올의 과정을 거쳐 증류수에서 hydration 하였다.

내인성 과산화효소의 활성을 억제하기 위해 3% H_2O_2 와 반응시켰으며, 항원성노출을 증가시키기 위해 microwave에 800 watt로 5분간 데운 citrate buffer (10 mM, pH 6.0)에 5분간 조직 절편을 담근 후 계면활성제인 인산염 완충액으로 10분간 2회 세척하였다.

조직 절편을 2% normal blocking serum (goat serum) (LSAB kit, Dako, Glostrup, Denmark)과 실온에서 30분간 방치시켜 비특이적 결합을 막아준 뒤, 세척하지 않고 일차 항체인 anti-rabbit iNOS immunoglobulin (Upstate biotechnology, Lake Placid, NY, USA)과 anti-rabbit nNOS IgG (Upstate biotechnology, Lake Placid, NY, USA)과 각각 4°C 냉장고에서 밤새 방치하였다. 인산염 완충액으로 10분간 세척한 후, link antibody인 이차 항체 biotinylated anti-rabbit IgG (LSAB kit, Dako, Glostrup, Denmark)와 30분간 방치시킨 다음, streptavidin-horse radish peroxidase (LSAB kit, Dako, Glostrup, Denmark)와 30분간 방치시키고, 인산염완충액으로 세척 후 Nova RED (Nova RED substrate kit, VECTOR laboratories,

Burlingame, CA, USA)로 10분간 발색시켰다.

Mayer's hematoxylin으로 대조 염색 후 70% 저농도에서 100% 고농도의 알코올과 xylene으로 탈수시킨 후 현미경으로 관찰하였다.

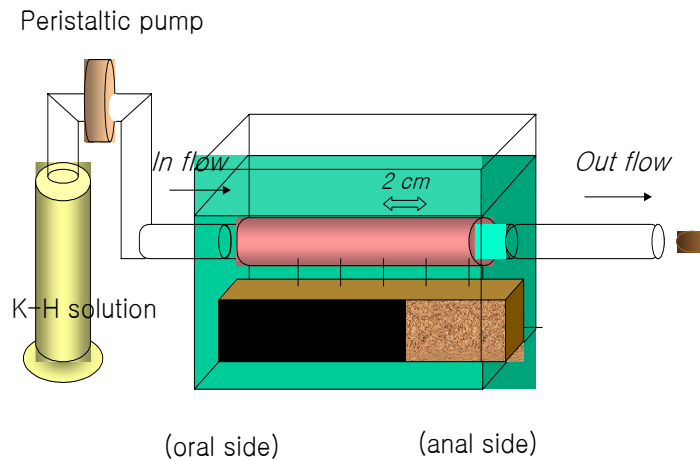


그림 1. Measurement of colonic transit time. The chamber for the colonic transit time study is shown. An artificial feces was inserted into the oral side of the lumen, and then it moved toward the anal side by intraluminal perfusion via a peristaltic pump.

III. 결 과

1. 대조군과 TNBS 주입군에서의 대장통과 시간의 측정

대장통과 시간은 대조군(n=5)에서 71.7 ± 6 초, 에타놀 처치군(n=5)에서 57.8 ± 8.7 초 였다. 약제 주입 후 3일째부터 7일, 14일에 걸쳐 대조군에 비하여 유의하게 지연되었으며, 7일째(n=7)에 1606.8 ± 229.7 초로 가장 지연되었다(표 1).

2. 대조군과 TNBS 주입군에서의 nNOS 양성 세포의 분포

대조군에서 nNOS 양성 세포는 점막, 점막하층, 고유근층, 점막하 신경층, 그리고 장근 신경총에서 골고루 관찰되었다(그림 2). TNBS 주입군에서는 주로 염증이 유발된 점막 및 점막하층에서 nNOS 양성 세포의 감소가 관찰되었으나, TNBS 노출기간에 따른 변화는 관찰되지 않았다(그림 2, 6). 각 군에서 장근 신경총내의 nNOS 양성 신경세포의 수는 차이를 보이지 않았다(그림 3, 6).

3. 대조군과 TNBS 주입군에서의 iNOS 양성 세포의 분포

대조군에서 iNOS 양성 세포는 주로 점막하 신경총과 장근 신경총에서 관찰되었다(그림 4, 5). TNBS 주입군에서는 주로 염증이 유발된 점막 및 점막하층에서 iNOS 양성 세포의 증가가 관찰되었으나, TNBS 노출기간에 따른 변화는 관찰되지 않았다(그림 4, 6). 각 군에서 장근 신경총내의 iNOS 양성 신경세포의 수는 차이를 보이지 않았다(그림 5, 6).

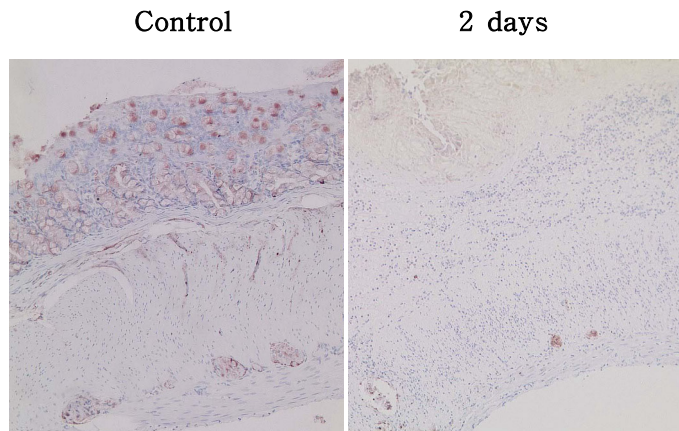


그림 2. nNOS immunoreactivity. In control, nNOS immunoreactivity was present in the mucosa, submucosa, lamina propria, and in ganglion cells within the myenteric plexus. Two days after the induction of colitis, exfoliation of the epithelium, disorganization of the mucosal architecture and submucosal edema were visible, and nNOS immunoreactivity was decreased in the mucosa and submucosa. Magnification: 100 μ m.

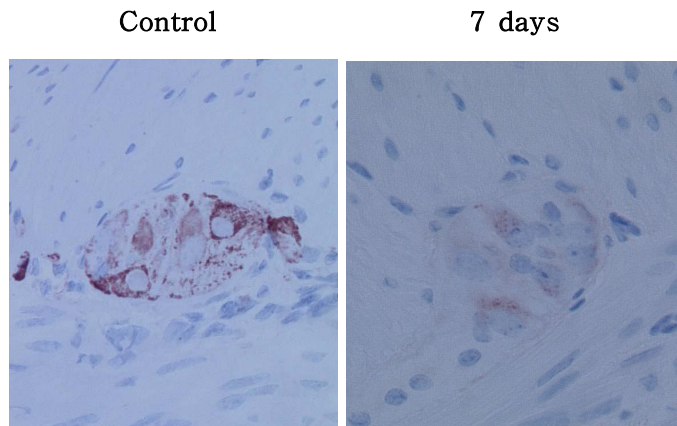


그림 3. nNOS immunoreactivity in the myenteric plexus. Seven days after the induction of colitis, the injured mucosa and thickened muscle were evident (not shown), while the number of nNOS immunoreactive ganglion cells in the myenteric plexus was similar to controls. Magnification: 400 μ m.

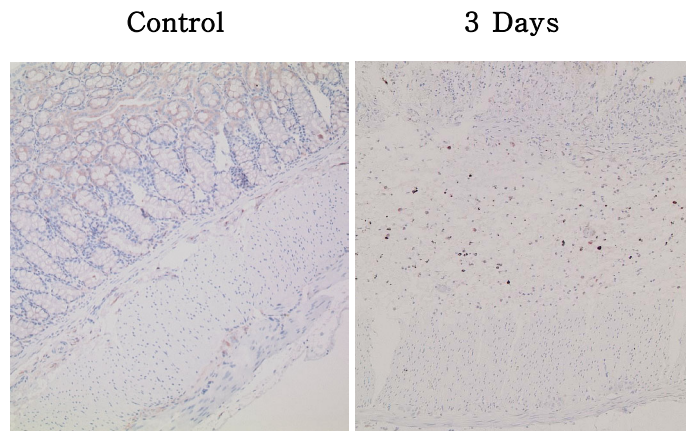


그림 4. iNOS immunoreactivity. Three days after the induction of colitis, submucosal edema and infiltration of many inflammatory cells were seen, and iNOS immunoreactivity was increased in the mucosa and submucosa compared to that in control. Magnification: 100 μ m.

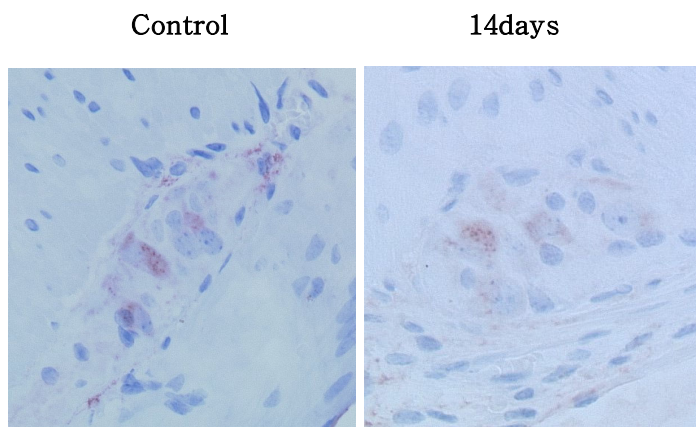


그림 5. iNOS immunoreactivity in the myenteric plexus. Fourteen days after the induction of colitis, the number of distribution of iNOS immunoreactive ganglion cells in the myenteric plexus was not changed compared to that in control. Magnification: 400 μ m.

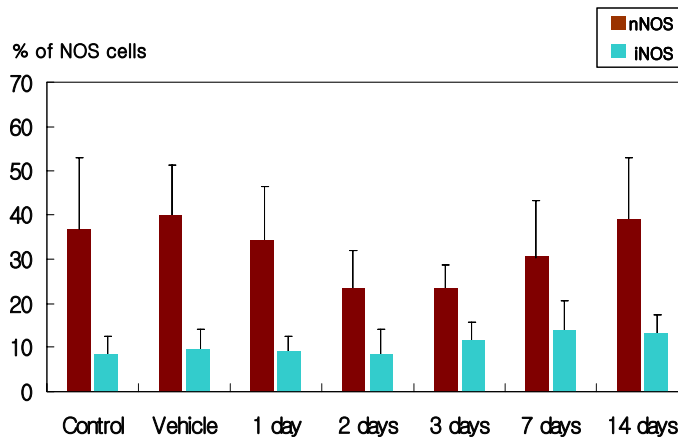


그림 6. nNOS and iNOS immunoreactive ganglion cells in the myenteric plexus. In the myenteric plexus, the number of nNOS and iNOS immunoreactive ganglion cells were not changed and showed no statistical significance, along the course of colitis.

표 1. Colonic transit time in TNBS induced colitis

	Control ¹ (n=5)	Vehicle ² (n=5)	1day ³ (n=7)	2day (n=7)	3day (n=7)	7day (n=7)	14day (n=7)
Colonic transit time ⁴	71.7± 6.17	57.8± 18.77	74.4± 9.61	152.7± 113.79	871.7± 263.94(*)	1606.8± 229.81(*)	1052.2± 83.21(*)

¹ Normal saline 0.3 mL was administrated into the colon in control.

² 50% ethanol 0.3 mL was administrated into the colon in vehicle.

³ Dates were calculated after administration of TNBS.

⁴ Colonic transit time was measured in seconds, and expressed as mean ± standard deviation. An asterisk(*) denotes $p < 0.05$.

IV. 고 찰

위장관의 운동은 다양한 원인의 위장관 염증에 의해 변화된다고 알려져 있다. 임상적으로 궤양성 대장염 환자의 경우 대장의 근전기적 활성화도 및 대장통과시간의 변화가 동반되며,^{13,14} 크론병 환자에서 채취한 회장 윤상근(circular muscle)을 이용한 장력 실험상 무스카린성 수용체 효현제인 carbachol에 대한 수축이 증가된다는 보고가 있다.¹⁵ 실험적으로는 소장내 박테리아가 과증식하게 되면, 소장의 정상적인 식단 운동 주기가 저해된다고 하며,¹⁶ 쥐의 장 근육 절편을 이용한 실험적 대장염 모델에서 근육 장력이 감소됨이 보고되었다.¹⁷

근래에는 과민성 장증후군의 한 병인으로서 급성 감염 후 속발해서 생긴 감염 후 과민성 장증후군(post-infectious irritable bowel syndrome)에 대한 연구가 주목을 받고 있다. 여러 전향적 연구들에서는 급성 박테리아성 위장염 환자의 7-33%에서 과민성 장증후군 증상이 발생하였다고 보고하고 있고,^{18,19} 장내 선충(nematode)을 감염시킨 생쥐를 이용한 실험에서는 감염에 의한 장 점막의 일시적 염증은 장 신경과 근육의 기능 변화를 유발하고, 이러한 변화는 점막의 염증이 호전된 후에도 지속됨을 관찰하여 감염 후 과민성 장증후군의 발생에 대한 실험적 근거를 제시하였다.²⁰

최근 박 등³은 기니 픽에게 TNBS로 유도한 실험적 대장염 모델을 만든 후, 시간 경과에 따른 염증 정도를 관찰하고 대장 근육 장력 및 대장통과 시간의 변화를 관찰하였다. TNBS는 hapten으로 작용하여 면역기전을 유발하며, 점막 투과를 원활하게 하기 위해 에타놀에 녹여 주입시 TNBS가 장벽으로 들어가 병변이 유발되며, 점막 및 전벽성 염증을 초래하여 크론병과 유사한 소견을 보인다. 그 결과, 육안적 및 현미경적 염증의 정도는 TNBS 주입 후 2일째에 가장 심하였고, 대장통과 시간은 TNBS 주입 후 3일, 7일, 14일째 대조군에 비하여 유의하게 지연되었으나, 카바콜에 반응하는 대장 근

육의 수축 정도는 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다.³ 따라서, 대장통과 시간 지연의 기전으로는 평활근 세포의 무스카린성 수용체에 변화가 초래된 평활근 자체의 문제는 아님을 알 수 있었고, 이것을 설명하기 위한 후속 연구로, 시간의 경과에 따른 대장 장벽내 NOS 등의 신경전달물질들의 분포에 대한 면역조직화학염색 등의 필요성을 제시하게 된 것이다.

최근 Mizuta 등²¹이 dextran sulfate sodium (DSS)을 흰쥐에게 주입하여 유발시킨 대장염 모델에서 원위부의 대장통과 시간이 지연되었고, 이는 원위부 대장에서 미측 윤상근의 이완을 담당하는 장근 신경총내의 nNOS의 활성화도 및 생성의 감소에 의한다고 보고하였다. 앞서 서술한 대로, 장근 신경총은 위장관 연동운동의 조절에 중추적인 역할을 하며,¹ 이로부터 대장통과에 중요한 매개물질로 작용하는 NO 유리의 장애는 대장통과를 지체시킬 수 있다고 추론한 것이다.²¹ 반면, 조직을 iNOS의 상대적 선택적 길항제인 aminoguanidine과 반응시켰을 때, 근육층 이하에서 iNOS의 활성도를 전혀 측정할 수 없어 감소된 nNOS의 활성화도에 iNOS가 기여한다고 보기는 어렵다고 보고하였고, 감소된 nNOS 활성화도의 기전으로 cytokine 매개과정(cytokine-mediated process)을 추정하였다.²¹ 이것은 장근 신경총내에 iNOS와 nNOS의 분포가 대장통과 시간의 변화에 영향을 미칠 것이라는 저자의 생각과 차이를 보였으나, DSS는 점막과 점막하층에 국한되어 염증을 일으켜 임상적으로 궤양성 대장염과 유사한 소견을 보이므로, 근육층 및 그 이하 장근 신경총에서의 iNOS 활성화도는 높지 않았을 것이라는 점과 흰쥐와 기니 픽의 종의 차이 등을 고려하여 생각해 보아야 할 것이다. Mizuta 등²¹의 보고를 설명하기 위해서 cytokine 매개 과정에서 nNOS 유전자를 억제할 수 있는 gamma interferon²² 등에 대한 추가 연구가 필요하다고 생각된다.

한편 Miampamba 등¹⁰은 흰쥐에서 TNBS 대장염을 유발시키고 장

벽과 장근 신경총 등에서 면역조직화학 염색을 통해 iNOS, nNOS 및 대장염을 유발 혹은 악화시키는 NO의 산물인 peroxynitrite의 분포를 측정하였다. 염증 부위에 증가된 iNOS가 peroxynitrite 형성을 통해 조직의 손상을 초래하였고, 염증의 후기에 윤상근 신경조직과 장근 신경총내에서 iNOS가 발견됨으로서 손상된 신경조직의 재생(re-innervation and compensatory growth)에도 iNOS가 일부 관여할 것이라고 추정하였는데, 손상된 조직에서 증가된 iNOS로부터 신경을 보호하기 위해 장근 신경총내 신경원에서 superoxide dismutase가 함께 발현되어 신경보호적인 역할(neuroprotective role)을 할 것이라고 추론하였다.¹⁰ 또한, nNOS의 활동성은 대장염 유발 후 점막 및 점막하층에서 뚜렷히 감소하였으며, 윤상근 신경조직에서 약간의 감소를 보였으나 장근 신경총내에서는 대조군과 비교하여 차이가 없다고 보고하여, 본 연구의 결과와 유사한 소견을 보였다.

Deng 등¹¹이 흰쥐를 이용한 또 다른 대장염 모델에서 nNOS mRNA가 장벽내에서 감소하였고, 이는 염증으로 증가된 iNOS에서 생성된 NO에 의해 하향조절(down-regulation)된 것이라고 보고하였다. 저자도 염증으로 증가된 NO에 의한 nNOS의 장근 신경총내의 하향조절이 있을 것이라는 가정하에 연구를 진행하였다. 그러나, Miampamba¹⁰에 의하면 신경조직과 장근 신경총내에서 nNOS 활동성 세포의 분포는 염증과 상관 관계가 없었고, 염증과 연관되어 어떠한 신경학적 변화도 규명할 수 없었으며, nNOS는 분해에 저항적이거나 대사율이 느리거나, 하향조절이 있더라도 일시적일 것이라고 보고하였다. 이것은 본 연구에서 저자가 기니 픽에서 장근 신경총내에 nNOS의 활성도가 염증의 정도와 상관관계가 없음을 확인한 결과와 같은 소견을 보였다. nNOS의 이러한 성질을 밝히기 위해서는 nNOS mRNA와 대사산물인 단백에 대한 후속 검사가 필요하다고 생각된다.

연구의 결과들이 일치하지 않는 이유는 저마다 실험동물의 종이

다르고, 채취한 대장부위의 차이 및 각 대장염 모델에서 유발된 염증 반응의 성질의 차이에서 비롯된다는 보고가 있다.^{25,26} 그러나 여러 연구들이 장근 신경총을 대상으로 하는 것은, 유독 장근 신경총의 신경세포들이 작은 생쥐에서 인간에 이르는 모든 포유류에서 유사한 배열을 보이며 위장관 운동을 조절하는 중추역할을 담당하고 있기 때문일 것¹으로 생각된다. 본 연구에서는 TNBS 유도 기니 픽 대장염 모델에서 염증에 의해 대장통과 시간이 변화된 것과 장근 신경총내의 신경전달물질의 분포와의 연관성을 알아보고자 하였고, 결론적으로 장근 신경총내 nNOS와 iNOS 양성 세포의 분포는 대장통과 시간 변화에 주 역할을 하지 않는 것으로 생각되어진다. 본 연구에서는 신경전달물질 양성 세포의 수를 세어 염증군과 대조군을 비교하였으나, 추후 양성 세포로 판단된 세포간의 NO 합성제의 밀도의 차이를 평가하는 등의 후속연구가 필요하다고 생각된다. 또한, 염증 유발시 점막 및 점막하층에서 증가한 수 많은 염증세포에서 발생하였을 iNOS의 산물인 NO의 영향도 고려되어야 할 것이라 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는 기니 픽에게 TNBS로 유도한 실험적 대장염 모델에서 발생한 대장통과 시간의 지연의 기전을 알아보고자 기니 픽 대장 조직절편에서 iNOS와 nNOS에 대한 면역조직화학염색을 실시하여, TNBS 노출 기간에 따른 iNOS와 nNOS의 장근 신경총 및 장벽 내 분포를 조사하고 대장통과 시간과의 상관 관계를 알아보려 했으며, 다음과 같은 결과들을 얻었다.

1. 대조군과 비교하였을 때 대장통과 시간의 지연은 TNBS 주입 후 3일 쯤부터 7일, 14일에 걸쳐 유의하게 지연되어 7일째에 가장 심하였다.

2. 대조군에서 nNOS 양성 세포는 점막, 점막하층, 고유근층, 점막하 신경총, 그리고 장근 신경총에서 골고루 관찰되었다. TNBS 주입군에서는 주로 염증이 유발된 점막 및 점막하층에서 nNOS 양성 세포의 감소가 관찰되었으나, TNBS 노출기간에 따른 변화는 관찰되지 않았다. 각 군에서 장근 신경총내의 nNOS 양성 신경세포의 수는 차이를 보이지 않았다.

3. 대조군에서 iNOS 양성 세포는 주로 점막하 신경총와 장근 신경총내에서 관찰되었다. TNBS 주입군에서는 주로 염증이 유발된 점막 및 점막하층에서 iNOS 양성 세포의 증가가 관찰되었으나, TNBS 노출기간에 따른 변화는 관찰되지 않았다. 각 군에서 장근 신경총내의 iNOS 양성 신경세포의 수는 차이를 보이지 않았다.

이상의 결과로 TNBS 유도 기니 픽 대장염에서 대장통과시간이 유

의하게 지연되었으며, 장근 신경총내 nNOS와 iNOS 양성 세포의 분포는 대장통과시간 변화에 주 역할을 하지 않는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Kunze W. A. A, Furness J. B. The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu Rev Physiol* 1999;61: 117-42.
2. Collins SM. The immunomodulation of enteric neuromuscular function: Implications for motility and inflammatory disorders. *Gastroenterology* 1996;111:1683-1699.
3. 박효진, 지상원, 임정현, 이상인. Altered colonic motor functions in experimental colitis of guinea pigs. *대한소화관운동학회지* 2003; 9:53-58.
4. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell* 1994;78:915-918.
5. Moncada S. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 1992;145:201-227.
6. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992;6:3051-3064.
7. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-142.
8. Boughton-Smith NK, Evans SM, Hawkey CJ, et al. Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Lancet* 1993;342:338-340.
9. Middleton SJ, Shorthouse M, Hunter JO. Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. *Lancet* 1993;341:465-466.
10. Miampamba M, Sharkey KA. Temporal distribution of neuronal and inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine during colitis in rats. *Neurogastroenterol Mot* 1999;11:193-206.

11. Deng Y, Qui BS, Vallance BA, Collins SM. Expression of two isoforms of neuronal nitric oxide synthase in the intestine of rats: selective down-regulation during inflammation. *Gastroenterology* 1997;112:A957.
12. Seo HG, Takata I, Nakamura M, et al. Induction of nitric oxide synthase and concomitant suppression of superoxide dismutases in experimental colitis in rats. *Arch Biochem Biophys* 1995;324:41-47.
13. Rao SCC, Read NW, Brown C, Bruce C, Holdsworth CD. Studies on the mechanism of bowel disturbance in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1987;93:934-940.
14. Snape WJ Jr., Williams R, Hyman PE. Defect in colonic smooth muscle contraction in patients with ulcerative colitis. *Am J Physiol* 1991;261:G987-991.
15. Vermillion DV, Huizinga JD, Riddell RH, Collins SM. Altered small intestinal muscle function in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1993;104:1690-1699.
16. Vantrappen G, Jannsens J, Hellemans J, Ghoois Y. The interdigestive motor complex of normal subjects and patients with bacterial overgrowth of the small intestine. *J Clin Invest* 1977;59:1158-1168.
17. Crosthwaite AI, Huizinga JD, Fox JE. Jejunal circular muscle motility is decreased in nematode infected rat. *Gastroenterology* 1990;98:59-65.
18. Gwee KA, Leong YL, Graham C, et al. The role of psychological and biological factors in postinfective gut dysfunction. *Gut* 1999;44:400-406.
19. Neal KR, Hebden J, Spiller R. Prevalence of gastrointestinal

symptoms six months after bacterial gastroenteritis and risk factors for development of the irritable bowel syndrome: postal survey of patients. *BMJ* 1997;314:779-782.

20. Barbara G, Vallance BA, Collins SM. Persistent intestinal neuromuscular dysfunction after acute nematode infection in mice. *Gastroenterology* 1997;113:1224-1232.

21. Mizuta Y, Isomoto H, Takahashi T. Impaired nitrenergic innervation in rat colitis induced by dextran sulfate sodium. *Gastroenterology* 2000;118:714-723.

22. Bandyopadhyay A, Chakder S, Rattan S. Regulation of inducible and neuronal nitric oxide synthase gene expression by interferon-gamma and VIP. *Am J Physiol* 1997;272:C1790-1797.

23. Miller MJS, Thompson JH, Zhang XJ, et al. Role of inducible nitric oxide synthase expression and peroxynitrite formation in guinea pig ileitis. *Gastroenterology* 1995;109:1475-1483.

24. Foxx-Orenstein AE, Grider JR. Regulation of colonic propulsion by enteric excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Am J Physiol* 1996;271:G433-437.

25. Sanger GJ, Bennett A. Regional differences in the response to prostanoids of circular muscle from guinea-pig isolated intestine. *J Pharm Pharmacol* 1980;32:705-708.

26. Grossi L, McHugh K, Collins SM. On the specificity of altered muscle function in experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 1993;104:1049-1056.

Abstract

Altered colonic transit in TNBS-induced experimental colitis of guinea pig and distribution of nitric oxide synthase in the colonic wall

Seung Hyun Cho

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Hyojin Park)

Inflammation-induced alterations in smooth muscle contractility may be due to effects on smooth muscle itself, or its response to neurotransmitters or to effects on enteric nerves.

Colonic transit in trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis of guinea pigs is delayed significantly, but it is not related to the muscarinic receptor-mediated contractions.

In dextran sulfate sodium-induced colitic rat, the delay in colonic transit was caused by decreased activity and production of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in the myenteric plexus in the distal colon.

In this study, we investigated the distribution of inducible NOS (iNOS) and nNOS immunoreactive cells in the myenteric plexus and colonic wall to explain the involvement of NOS in delayed colonic transit in TNBS-induced colitic guinea pig.

Colonic transit was delayed significantly at 3, 7 and 14 days after administration of TNBS compared to control.

In control, nNOS immunoreactivity was present in the mucosa, submucosa, lamina propria, muscularis mucosa, and in ganglion

cells within the myenteric plexus, while after TNBS, reduced nNOS cells were found. However, the number of nNOS immunoreactive ganglion cells in the myenteric plexus was similar to that seen in controls.

After administration of TNBS, iNOS immunoreactivity was increased in the mucosa and submucosa compared to that in control, but the number of distribution of iNOS immunoreactive ganglion cells in the myenteric plexus was not changed compared to that in control.

In conclusion, it is suggested that in TNBS-induced guinea pig colitis, delayed colonic transit is not associated with the expression of nNOS or iNOS in the myenteric plexus.

Key Words : colonic transit, colitis, nitric oxide synthase, tri-nitrobenzene sulfonic acid